Arnaldoa 19(2): 189 - 193, 2012 ISSN: 1815 - 8242

Influencia de la salinidad y nitrato de sodio en la producción de biomasa de *Tetraselmis* sp. (Chlorodendraceae)

Influence of salinity and sodium nitrate in the production of biomass in *Tetraselmis* sp. (Chlorodendraceae)

César Grosso Gamboa & Eloy López Medina

Laboratorio de Fisiología y cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo - PERÚ. *grosso_biotecnology@hotmail.com*

Resumen

La situación actual del ambiente demanda urgentemente fuentes alternativas de energía, basadas en procesos sustentables, renovables, que posibiliten la captura de CO_2. Las microalgas son una alternativa ventajosa para la producción de biodiesel, debido al elevado contenido de lípidos y perfil idóneo para la obtención del biocombustible, que éstas ofrecen. La presente investigación estudió el efecto de diferentes niveles de Nitrato de Sodio (2mM, 4mM, 8mM) y salinidad (0.8M, 1.0M, 1.5M) en el crecimiento y producción de biomasa en *Tetraselmis sp.* El cultivo se realizó en biorreactores cerrados de cultivo continuo, con inyección de aire estéril. Los experimentos se realizaron por triplicado y se mantuvieron a un fotoperiodo de 24 horas luz (24:0), y recuento celular diario por siete días. Los resultados expresaron que hubo una correlación negativa entre la salinidad y la densidad celular a concentraciones mayores de 53.76g/L (1.0M). La máxima densidad celular obtenida por efecto del Nitrato de Sodio (8mM) y Cloruro de Sodio (0.8M) fue $189.33x10^3$ y $42.68x10^3$ cel/mL. La menor densidad celular obtenida por efecto del Nitrato de Sodio (2mM) y Cloruro de Sodio (1.5M) fue $121.56x10^3$ y $4.124x10^3$ cel/mL. El medio con 8mM de Nitrato de Sodio fue el que mayor producción de biomasa seca significativa ($p<0.05$) presentó, con 0.529g en 800mL. El medio con 1.5M de Cloruro de Sodio fue el que más afectó la producción, con 0.012g.

Palabras clave: *Tetraselmis sp,* crecimiento celular, microalgas, salinidad, Nitrato de Sodio.

Abstract

The current situation demands urgent environmental alternative energy sources, based on sustainable processes, renewable; that allow the capture of CO_2. Microalgae are an advantageous alternative for biodiesel production owing to the high lipid content and profile suitable for the production of biofuels, they offer. This research studied the effect of different levels of sodium nitrate (2mM, 4mM, 8mM) and salinity (0.8M, 1.0M, 1.5M) in growth and biomass production of *Tetraselmis* sp. The cultivation was carried out in continuous culture closed bioreactors, with injection of sterile air. The experiments were performed in triplicate and maintained at a photoperiod of 24 hours light (24:0), and cell count daily for seven days. The results showed that there was a negative correlation between salinity and cell density at higher concentrations of 53.76g / L (1.0M). The maximum cell density obtained by the effect of sodium nitrate (8 mM) and sodium chloride (0.8M) was 189.33x103 and 42.68x103 cells / mL. The lower cell density obtained by the effect of sodium nitrate (2 mM) and sodium chloride (1.5M) was 121.56x103 and 4.124x103 cells / mL. The medium with 8 mM sodium nitrate was the highest production of dry biomass ($p <0.05$) had 0.529g in 800 ml. The medium with 1.5 M sodium chloride showed the production most affected with 0.012g.

Key words: *Tetraselmis* sp, cell growth, microalgae, salinity, sodium nitrate.

Introducción

Las dificultades ambientales causadas por los gases de invernadero, tales como la contaminación local del aire y el calentamiento global, son problemas que afronta la humanidad en la actualidad. Desde hace décadas, se conoce la estrecha relación entre el aumento continuo de emisión de gases de efecto invernadero y el cambio global. (Ludevid, 1997; Loera-Quezada, 2010).

Los gases causantes del efecto invernadero son, el Dióxido de Carbono (CO_2), Metano (CH_4), Oxido Nitroso N_2O, Vapor de Agua (H_2O), Ozono (O_3), Hidrofluorocarbonos o HFC, Perfluorocarbonos o PFC,

Hexafluoruro de azufre o SF_6 .

Entre los gases de efecto invernadero se encuentra el Dióxido de Carbono (CO_2), que es producido por la utilización de combustible fósil (petróleo, gas y carbón) y por el cambio de uso de la tierra (deforestación). Este gas ha contribuido a mantener una temperatura constante dentro de la tierra, sin embargo en la actualidad, es responsable de casi el 76 % del calentamiento global previsto para los próximos años (Ludevid, 1997).

Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de Dióxido de Carbono (CO_2) (Garibay, 2009; García, 2010)).

Los biocombustibles, desde una perspectiva etimológica, serían los combustibles de origen biológico, pero esta definición incluye al petróleo, ya que este procede de restos fósiles que existen desde hace millones de años. Una mejor definición es que son los combustibles de origen biológico obtenidos de manera renovable a partir de restos orgánicos. Los biocombustibles constituyen la primera fuente de energía que conoció la humanidad.

Dentro de las posibles fuentes de energías renovables destaca la biomasa microalgal, clave en el cumplimiento de los objetivos energéticos que se han planteado tanto en Europa como en Sudamérica. Dichos objetivos se centran en la diversificación energética, disminución de la dependencia de la energía externa y en la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero (García, 2010).

Actualmente los científicos definen a las algas como un "petróleo" biológico, al ser un recurso biológico renovable y que absorbe CO_2 de forma constante Con el fin de producir eficientemente biodiesel a partir de algas, se recomienda la elección de cepas con alto nivel de crecimiento y alto contenido en aceite (Cifuentes et al., 1996; Gomez & María, 1997; Garibay, 2009).

El cultivo industrial de las microalgas es un campo que en las últimas décadas están tomando creciente interés en muchos países debido a la particularidad especial que exhiben la bioproducción de su biomasa y metabolitos de aplicación en la industria de alimentos saludables, farmacéuticos y biomedicina (Leal *et al.*, 2005).

Material y métodos

Obtención del Material Biológico:

Se usó la microalgas *Tetraselmis* sp, proporcionadas por la Universidad de Santa - Chimbote.

Evaluación del efecto de la salinidad

La salinidad del medio se obtuvo agregando Cloruro de Sodio a un volumen de agua de mar hasta la concentración deseada. Se consideró que el agua de mar tiene una concentración de sal de 35 g/l. Aguilar (1995). Así, para llegar a una solución 1M (equivalente 58.44 g/l) se mezcló 18.76g de Cloruro de Sodio con agua de mar y se enrasó a 800mL.

Evaluación del efecto del Nitrógeno

La concentración salina usada en estas pruebas, fue la salinidad natural de agua de mar de Huanchaco, aproximadamente 35g/L (0.6M). Dado que uno de los factores influyentes en el cultivo de microalgas es la salinidad que conlleva en muchos casos, a un estado de estrés salino lo cual altera la producción de sus diversos metabolitos (Serpa, 2005; López, 2008).

Respecto a las concentraciones de la fuente de Nitrógeno ($NaNO_3$), se probaron tres niveles de concentración 2mM, 4mM y 8mM.

En cada tratamiento se usó 800 mL de la solución experimental y se inoculó con 5 mL del cultivo stock mantenido en el mismo medio en fase estacionaria temprana. Cada tratamiento fue repetido tres veces al mismo tiempo (1x, 2x y 3x). Los tratamientos se expusieron a un fotoperiodo de luz continua (24:0).

Los cultivos fueron periódicamente muestreados y analizadas para determinar la densidad celular. Para determinar la densidad celular cada muestra fue fijada con formol al 0.5%.

Densidad celular

El crecimiento de la microalga se determinó mediante el recuento celular diario, hasta haber

cumplido 7 días desde el día del inoculo, utilizando una cámara de NEUBAUER o HEMOCITOMETRO.

Análisis estadístico

En cada uno de los factores analizados (salinidad y concentración de Nitrato) y en las variables analizadas se compararon los datos mediante el método de ANOVA. La determinación de homogeneidad y heterogeneidad de tratamientos se realizó mediante la prueba Tukey (Sokal & Rohlf, 1995).

Resultados

Tabla1. Valores originales y sus estimadores aritméticos de la densidad celular de *Tetraselmis* sp ($x10^3$ cel/mL) obtenida el día 7.

TRATAMIENTOS		REPETICIONES			ESTIMADORES			
Código	Cultivo	1	2	3	$\sum$	x	S^2	S
T1	$NaNO_3$ (2mM)	115.25	113.883	135.55	364.683	121.56	147.236	12.134
T2	$NaNO_3$ (4mM)	134.02	136.853	165.36	436.233	145.41	300.478	17.334
T3	$NaNO_3$ (8mM)	192.53	189.015	186.43	567.975	189.33	9.375	3.062
T4	NaCl (0.8M)	83.47	74.64	77.12	235.230	78.41	20.740	4.554
T5	NaCl (1.0M)	40.35	42.13	45.56	128.040	42.68	7.013	2.648
T6	NaCl (1.5M)	5.02	3.502	3.85	12.372	4.12	0.632	0.795
Blanco	Agua de mar	108.86	113.23	112.08	334.170	111.39	5.131	2.265

Tabla 2. Valores originales y sus estimadores aritméticos de la biomasa total (g) de *Tetraselmis sp* obtenida el día 7.

TRATAMIENTOS		REPETICIONES			ESTIMADORES			
Código	Cultivo	1	2	3	$\sum$	x	S^2	S
T1	NaNO3 (2mM)	0.322	0.318	0.379	1.019	0.340	0.001	0.034
T2	NaNO3 (4mM)	0.374	0.382	0.462	1.218	0.406	0.002	0.049
T3	NaNO3 (8mM)	0.538	0.528	0.521	1.587	0.529	0.000	0.009
T4	NaCl (0.8M)	0.233	0.209	0.215	0.657	0.219	0.000	0.013
T5	NaCl (1.0M)	0.113	0.118	0.127	0.358	0.119	0.000	0.007
T6	NaCl (1.5M)	0.014	0.010	0.011	0.035	0.012	0.000	0.002
Blanco	Agua de mar	0.304	0.316	0.313	0.934	0.311	0.000	0.006

Discusión

Entre los diferentes componentes del medio de cultivo, la fuente y concentración de nitrógeno determinan en gran medida los cambios en el crecimiento y composición bioquímica de una especie microalgal, influyendo fundamentalmente, sobre el contenido proteico y de la fracción lipídica (Share, 2007; Rosales *et al.*, 2008).

El medio con 8mM de Nitrato de Sodio fue el que mayor producción de biomasa seca significativa ($p<0.05$) presentó, con 0.529g en 800mL, debido a que un factor importante en la preparación de un medio de cultivo para microalgas es la forma en la cual el nitrógeno es suministrado. Generalmente, las microalgas son capaces de utilizar nitrato, amonio o urea, siendo el

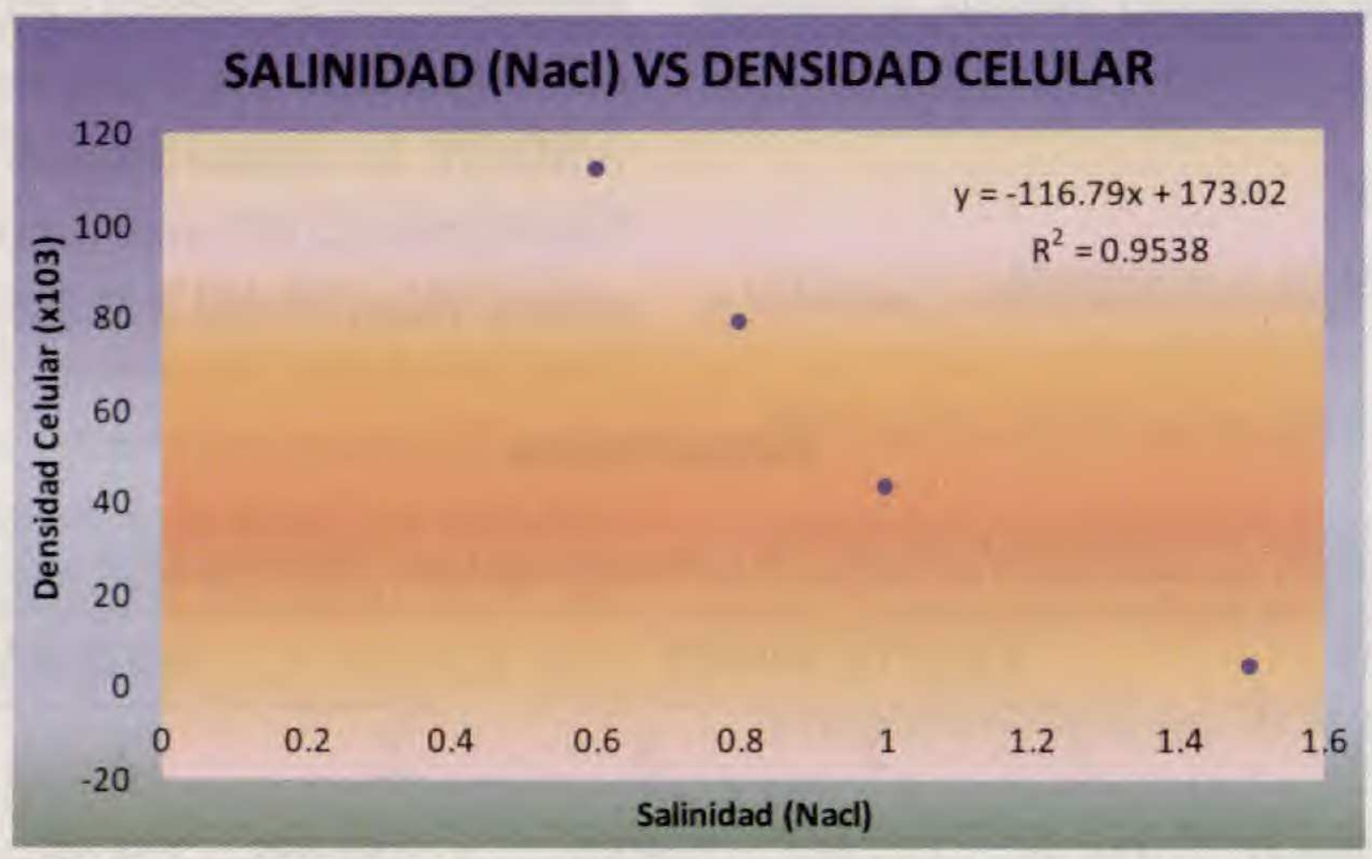

Fig. 1. Coeficiente de correlación lineal de Salinidad vs. Densidad celular de *Tetraselmis* sp.

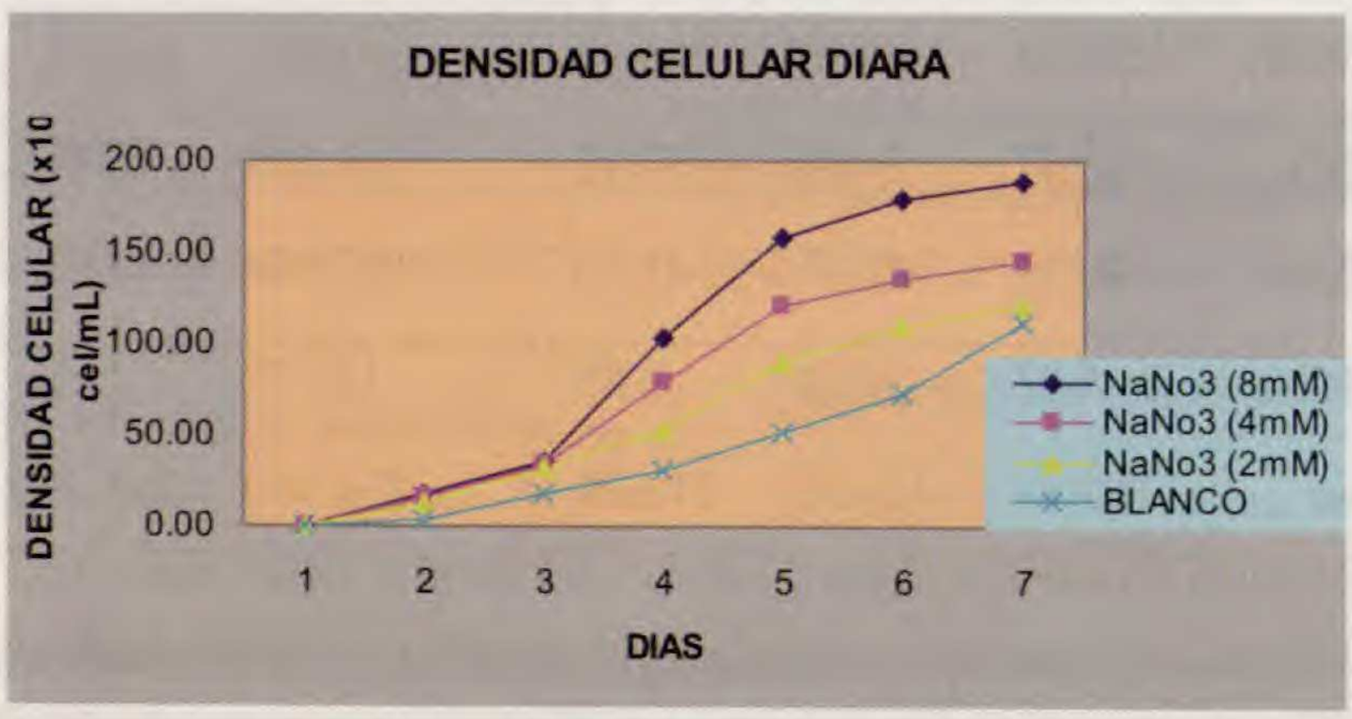

Fig. 2. Monitoreo de la densidad celular de *Tetraselmis* sp ($x10^3$ Cel/mL) relacionando los 3 tratamientos de $NaNO_3$ con el Blanco.

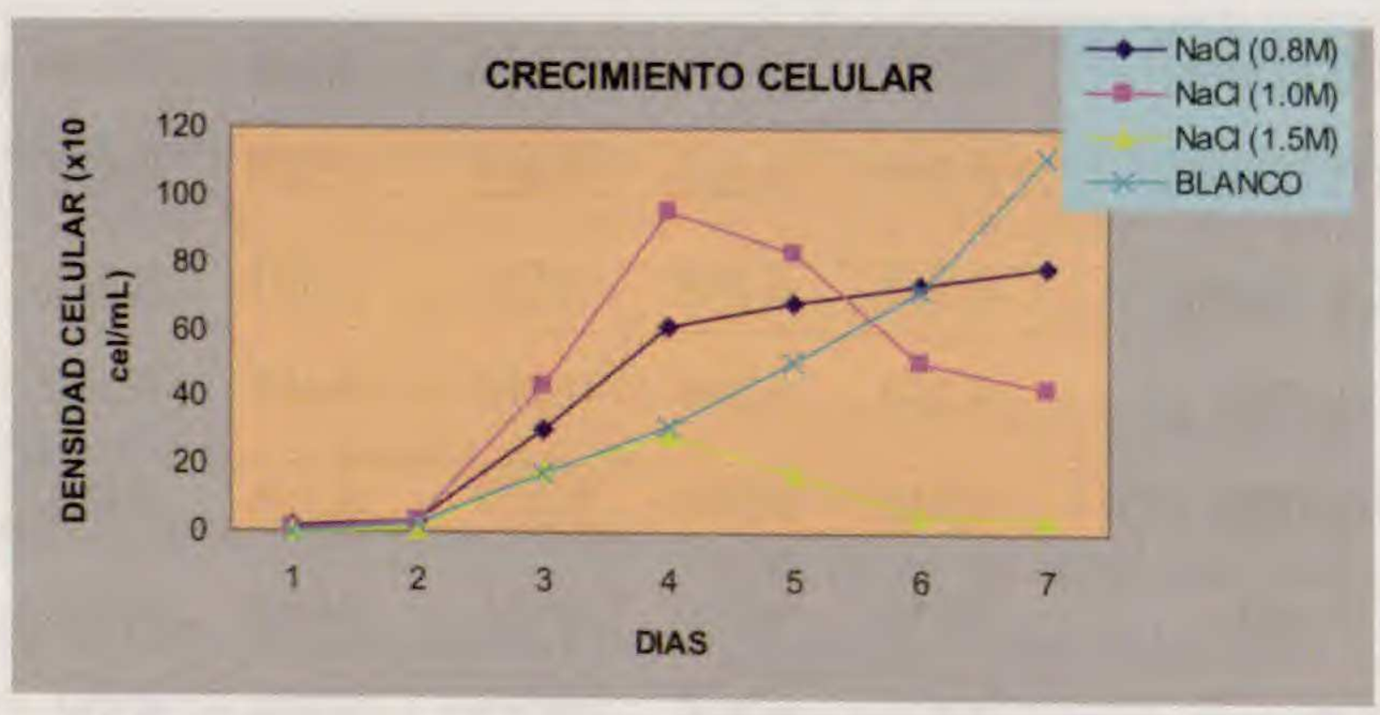

Fig. 3. Monitoreo de la densidad celular de *Tetraselmis* sp ($x10^3$ Cel/mL) comparando los 3 tratamientos de $NaNO_3$ con el Blanco.

nitrato uno de las fuentes mas utilizadas en el cultivo de microalgas. Por su toxicidad a altas concentraciones, el nitrito es menos conveniente como fuente de nitrógeno; éste tiene, además, un efecto negativo sobre la productividad de los cultivos de algunas especies de microalgas (Serpa, 2006; Loera, 2010).

Por otra parte la máxima densidad celular obtenida por efecto del Nitrato de Sodio (8mM) que a pesar de no presentar diferencias significativas, su valor fue mayor con respecto a los demás tratamientos, esto fue debido a que se utilizó nitrato como fuente de nitrógeno, reportándose que alcanza la misma velocidad de

crecimiento que si se utilizara amonio o urea, siendo el nitrato la fuente más importante frecuentemente disponible en medios naturales. De forma general, en la naturaleza, las microalgas rara vez disponen de abundante concentración de nitrógeno, lo que ha inducido a la explotación eficiente de cualquier fuente potencialmente disponible sin cambios apreciables en las tasas de crecimiento (Serpa, 2005; 2006).

Conclusiones

Los resultados expresaron que hubo una correlación negativa entre la salinidad y la densidad celular a concentraciones mayores de 35g/L (0.6M).

La máxima densidad celular obtenida por efecto del Nitrato de Sodio (8mM) y Cloruro de Sodio (0.8M) fue $189.33x10^3$ y $42.68x10^3$ cel/mL respectivamente.

La menor densidad celular obtenida por efecto del Nitrato de Sodio (2mM) y Cloruro de Sodio (1.5M) fue $121.56x10^3$ y $4.124x10^3$ cel/mL.

Literatura citada

Cifuentes, A.; M. Gonzales; O. Parra & M. Zuñiga 1996. Cultivo de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. Revista Chilena de Historia Natural 69: 105-112.

García, M. J. 2010. Captura de CO2 mediante algas unicelulares. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid, 118 p.

Garibay, A.; R. Vásquez; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas. BioTecnología, Vol. 13 (3): 38-61.

Gómez, L. M. 1997. Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Tesis Para optar el grado de Doctor. Universidad de la Coruña. España. 265 pp.

Leal, E.; C. Tapia & C. Vargas. 2005. Crecimiento de *Dunaliella salina* con polvillo de horno de cemento subproducto de la fabricación industrial del cemento. Dugandia 1 (2): 9-16.

Loera, O. 2010 "Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades". Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(1):91-116

López, Y. K. 2008. Caracterización genética y de metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de *Dunaliella salina* bajo condiciones de estrés salino. Tesis para obtener el grado de Maestro. Instituto Politécnico Nacional. Tamaulipas. México. 79 pp.

Rosales, L. N.; D. Avendaño; A. Otero & E. Morales. 2008. Crecimiento, producción de pigmentos y proteínas de la microalga *Dunaliella viridis* (Chlorophyta) en cultivos semicontinuos. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 42(3): 323-334.

Serpa, R. F. & A. Calderón. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. Ecología Aplicada, 4(1-2): 128-133.

Serpa, R. F. & A. Calderón. 2006. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Teod. Ecología Aplicada, 5(1-2): 128-133.

Share, C. & M. Huesemann. 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. Journal of Undergraduate Research VII: 115-122.

Sokal, R. & F. Rohlf. 1995. The principles and practice of statistics in biological research. Third Edition. W.H.Freeman,New York. 887 p.